

Received: 2015.02.04
Accepted: 2015.08.24
Published: 2015.12.31

Ligandy wielofunkcyjne – nowa strategia poszukiwania leku w terapii chorób o złożonej etiologii*

Multifunctional ligands – a new approach in the search for drugs against multi-factorial diseases

Tomasz Wichur, Barbara Malawska

Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku Katedry Chemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Streszczenie

Selektywne leki skierowane na jeden cel biologiczny okazują się często nieskuteczne w leczeniu schorzeń o złożonym patomechanizmie, np. choroby Alzheimera, co skłania badaczy do projektowania ligandów wielofunkcyjnych, tj. cząsteczek zdolnych do oddziaływania z kilkoma wybranymi celami biologicznymi. W pracy przedstawiono zarys koncepcji projektowania leku wielofunkcyjnego oraz przykłady zastosowania tej metody w poszukiwaniu leku w terapii choroby Alzheimera. W projektowaniu ligandów wielofunkcyjnych opartym na wiedzy selektywne ligandy różnych celów biologicznych łączy się w jedną cząsteczkę. W strategii wykorzystującej badania przesiewowe biblioteki związków są poddawane testom oceniającym ich aktywność wobec wybranych celów biologicznych, w celu znalezienia cząsteczki o pożądanym profilu farmakologicznym. Istnieje również możliwość otrzymywania ligandów wielofunkcyjnych przeprowadzając selektywną optymalizację ubocznej aktywności leku i przekształcając ją w aktywność główną, z jednoczesnym zmniejszeniem lub całkowitym usunięciem pierwotnej aktywności. Rodzaj zastosowanej strategii projektowania ligandów wielofunkcyjnych oraz celów biologicznych wpływa na ich parametry fizykochemiczne i właściwości farmakokinetyczne. Choroba Alzheimera jest wieloczynnikową chorobą neurodegeneracyjną w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, związaną z powstawaniem wewnątrz neuronów splątków neurofibrylarnych, tworzonych przez hiperfosforylowane białko τ oraz zewnątrzkomórkowych złogów β -amyloidu (tzw. blaszek starczych). Aktualna terapia choroby obejmuje leki o działaniu objawowym poprawiające neuroprzekaznictwo cholinergiczne lub hamujące receptory glutaminianergiczne. W literaturze jest opis licznych przykładów związków, które w testach *in vitro* okazały się ligandami wielofunkcyjnymi. Większość to pochodne leków o właściwościach hamujących cholinoesterazy, zdolne także do hamowania agregacji A β oraz wykazujące działanie neuroprotekcyjne w testach cytotoxyczności wywołanej A β .

Słowa kluczowe:

ligandy wielocelowe • leki wielofunkcyjne • choroba Alzheimera • projektowanie leku • potencjalne leki w chorobie Alzheimera

*Opracowanie stanowi część pracy magisterskiej Tomasza Wichura, studenta Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w 2014 r. i powstało w trakcie realizacji grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki Nr: UMO-2012/07/B/NZ7/04253.

Summary

Selective drugs directed at a single biological target often prove ineffective in the treatment of diseases with a complex pathomechanism, e.g. Alzheimer's disease (AD). This situation prompts researchers to design multi-target-directed ligands (MTDLs), capable of interacting with a number of selected biological targets. The paper outlines the concept of the multi-target-directed ligand design and examples of its use in the search of a cure for AD. In the knowledge-based approach for designing MTDLs, selective ligands of different targets are combined in one molecule. In the screening-based approach, libraries of compounds are screened against selected targets, which allows one to find molecules with a desirable pharmacological profile. It is also possible to obtain multifunctional ligands by performing optimization of a drug with known side activity and transforming it into the main activity, with a simultaneous decrease or complete removal of the original activity. The type of biological targets and applied MTDL design strategy affect the physicochemical and pharmacokinetic properties of the resulting molecules. AD is a multifactorial neurodegenerative disease of the central nervous system associated with the formation of neurofibrillary tangles within neurons, formed by the hyperphosphorylated τ proteins, and extracellular β -amyloid deposits (senile plaques). Current AD therapy comprises symptomatic drugs that enhance cholinergic neurotransmission or inhibit glutamate receptors. The literature provides numerous examples of compounds which proved in *in vitro* tests to be multifunctional ligands. Most of them are derivatives of cholinesterase-inhibiting drugs, also capable of inhibiting the aggregation of A β and showing neuroprotective effects in A β -induced cytotoxicity assays.

Key words: multi-target-directed ligands • multifunctional drugs • Alzheimer's disease • drug design • potential anti-Alzheimer's drugs

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1189928>

Word count: 4401
Tables: 1
Figures: 8
References: 43

Adres autorki: prof. Barbara Malawska, Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku Katedry Chemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, 30-688 Kraków, ul. Medyczna 9; e-mail: mfmalaws@cyf-kr.edu.pl

WPROWADZENIE

W ostatnich latach zmieniało się podejście do projektowania leków, które wynika z ciągłego poszerzania się wiedzy na temat molekularnych podstaw funkcjonowania żywych organizmów. Chemia medyczna ze względu na swój interdyscyplinarny charakter podlega dynamicznemu rozwojowi, ale jednocześnie staje przed coraz trudniejszymi wyzwaniami, wśród których wymienić można poszukiwanie leków na choroby o złożonej etiologii oraz konieczność zapewnienia bezpieczeństwa farmakoterapii.

Obecnie obserwuje się wyraźny spadek liczby nowych leków, które pomyślnie przechodzą przez badania kliniczne i są następnie wprowadzane do terapii. Najczęstszymi przyczynami takiego stanu rzeczy są: brak potwierdzenia skuteczności działania u człowieka oraz toksyczność badanych związków. Stawia to pod znakiem zapytania słuszność strategii „jeden lek – jeden cel biologiczny”,

która od wielu lat dominuje w chemii leków. Źródłem tej strategii są osiągnięcia biologii molekularnej, związane z identyfikacją genów i produktów ich ekspresji, leżących u podstaw patologicznych zmian w funkcjonowaniu organizmu człowieka. Podstawowym założeniem w podejściu „jeden lek – jeden cel biologiczny” jest otrzymanie liganda o dużej selektywności, którego budowa zapewniałaby duże powinowactwo tylko do jednego celu biologicznego, przy jednoczesnym ograniczeniu możliwości wywoływania działań niepożądanych, wynikających z wiązania do innych celów biologicznych [12].

Choć stosowanie wspomnianej wyżej strategii przyczyniło się do stworzenia wielu skutecznych leków stosowanych obecnie w licznych schorzeniach, to jednak wciąż istnieją choroby, na które jak dotąd nie udało się znaleźć odpowiedniego leku [27]. Szczególnie trudno jest odkryć skuteczny lek w terapii chorób o złożonej etiologii jak choroby nowotworowe, czy wiele chorób ośrodkowego

układu nerwowego, w tym chorobę Alzheimera. W pracy przedstawiono koncepcję projektowania leku wielofunkcyjnego oraz przykłady jej zastosowania w poszukiwaniu leku w terapii choroby Alzheimera.

OD LEKU SELEKTYWNEGO DO LIGANDA WIELOFUNKCYJNEGO (LEKU WIELOCELOWEGO)

Analiza różnych połączeń (sieci) biologicznych np. wewnątrzkomórkowych, możliwa dzięki zastosowaniu narzędzi bioinformatycznych, wskazuje, że niejednokrotnie są one odporne na zmiany w obrębie pojedynczych węzłów tych sieci (np. enzymów) [37]. Połączenie tych obserwacji z tym, że wiele schorzeń (m.in. nowotwory czy choroby ośrodkowego układu nerwowego) wykazuje złożony patomechanizm, stanowi wytłumaczenie, dlaczego selektywne leki, skierowane na jeden cel biologiczny, okazują się często nieskuteczne w leczeniu tych chorób [16].

Wiele ze stosowanych obecnie w terapii leków, choć zaprojektowanych jako leki selektywne, oddziałują wewnątrz organizmu z wieloma makrobiocząsteczkami, przez co mają złożony mechanizm działania, ale także często korzystny profil terapeutyczny. Kwas acetylosalicylowy, powszechnie stosowany lek z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych, oprócz działania przeciwbólowego i przeciwzapalnego, wykazuje także aktywność przeciwpłytkową, co sprawia, że lek stosuje się również m.in. w profilaktyce choroby niedokrwiennej serca [5]. Bardzo często wielokierunkowe działanie cząsteczki leku odpowiada za pożądany skutek terapeutyczny. Klasycznym przykładem są leki działające w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, wśród których najskuteczniejsze okazują się związki o złożonym profilu farmakologicznym [35]. Wybrane przykłady leków zostaną omówione w dalszej części pracy.

Oddziaływanie na kilka celów biologicznych jest obecnie podstawą efektywnej terapii zakażenia wirusem HIV. Pacjentom zarażonym wirusem HIV podaje się kilka różnych substancji czynnych, które różnią się mechanizmem działania. Strategia ta, znana jako „wysoco aktywna terapia przeciwretrowirusowa”, HAART (highly active antiretroviral therapy), pozwala na zmniejszenie liczebności wirusa w organizmie człowieka. Wśród stosowanych związków można wymienić nukleozydowe i nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy, inhibitory proteaz, integraz oraz inhibitory wchłaniania wirusa HIV do wnętrza komórek [38].

Konieczność oddziaływania na kilka celów biologicznych, aby zapewnić skuteczność terapii, można realizować na trzy sposoby, przez podawanie pacjentowi:

- kilku leków równocześnie w postaci osobnych postaci leku/preparatów,
- preparatu złożonego, składającego się z kilku substancji aktywnych w jednej postaci leku,
- leku, którego struktura pozwala na jednoczesne oddziaływanie z kilkoma istotnymi z terapeutycznego punktu

widzenia celami biologicznymi, nazywanego ligandem wielofunkcyjnym [26,27].

Ponieważ stosowanie kilku substancji aktywnych jednocześnie wiąże się ze złożoną farmakokinetyką oraz farmakodynamiką, a także ryzykiem wystąpienia niebezpiecznych dla pacjenta interakcji, ostatnie z wymienionych podejść, bazujące na ligandzie wielofunkcyjnym, wydaje się szczególnie atrakcyjne [27].

Cząsteczki, które określa się jako ligandy wielocelowe lub wielofunkcyjne, można odnaleźć w naturze. Przykładem mogą być bleomycyny, antybiotyki glikopeptydowe o działaniu cytostatycznym wytwarzane przez szczep *Streptomyces verticillus*. Związki te są zbudowane z siedmiu reszt aminokwasowych i dwóch monosacharydów, L-glukozy oraz D-mannozy. Poszczególne elementy struktury bleomycyny umożliwiają cząsteczce: penetrację do komórki, związanie się z DNA, a następnie wywołanie pęknięcia dwuniciowej cząsteczki DNA na skutek generowania reaktywnych form tlenu przez związek chelatowy bleomycyna-Fe²⁺ [29,38].

KONCEPCJA LIGANDA WIELOFUNKCYJNEGO

Autorzy najważniejszych artykułów poświęconych koncepcji liganda wielofunkcyjnego, Morphy i Rankovic [27] proponują termin *designed multiple ligand* (DML), czyli w dosłownym tłumaczeniu zaprojektowany ligand wielokrotny. Podstawowe wydaje się tu określenie „designed”, które wskazuje, że DML zostały celowo zaprojektowane tak, aby oddziaływać z kilkoma wybranymi celami biologicznymi, w odróżnieniu od związków nieselektywnych, których złożony profil farmakologiczny jest niezamierzonym skutkiem oraz często źródłem poważnych działań niepożądanych [27]. W literaturze są używane także inne określenia na DML, wśród których można wymienić: *multi-target-directed ligands*, *multiple-binding ligands*, *dual ligands*, *multifunctional drugs*. W artykule stosuje się określenie ligandy wielofunkcyjne, które występuje oprócz innych określeń, takich jak leki wielocelowe lub leki wielofunkcyjne.

Strategie projektowania leków wieloligandowych

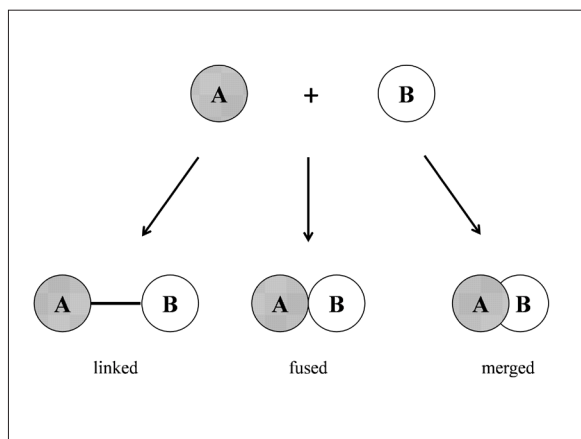
Wspomniani wcześniej Morphy i Rankovic, w pracy poświęconej ligandom wielofunkcyjnym [27], opisują dwie strategie projektowania leków:

- strategia oparta na wiedzy (*knowledge-based approach*, określana także jako *framework combination*),
- strategia wykorzystująca badania przesiewowe (*screening approach*).

Strategia oparta na wiedzy

Strategia oparta na wiedzy wykorzystuje znajomość aktywności biologicznej określonych związków. Polega na wybraniu dwóch selektywnych ligandów, z których każdy oddziałuje z innym celem biologicznym, a następnie

połączeniu ich w jedną cząsteczkę. Niezbędna jest tutaj jednak znajomość farmakoforów obu selektywnych ligandów, gdyż gwarantują aktywność każdego z ligandów wobec określonego celu biologicznego i muszą być obecne w projektowanym ligandzie wielofunkcyjnym. Dzięki temu może wykazywać aktywność podobną do cząsteczek wyjściowych, na bazie których został stworzony. Na rycinie 1 przedstawiono schematycznie, w jaki sposób mogą być łączone fragmenty dwóch selektywnych ligandów A i B, w celu otrzymania liganda wielofunkcyjnego.



Ryc. 1. Strategia łączenia dwóch selektywnych ligandów, A i B, w ligand wielofunkcyjny (dwufunkcyjny). Opracowano na podstawie [10]. Połączone za pomocą łącznika (linked), „zrośnięte, stopione” (fused), „przenikające się, zmieszane” (merged)

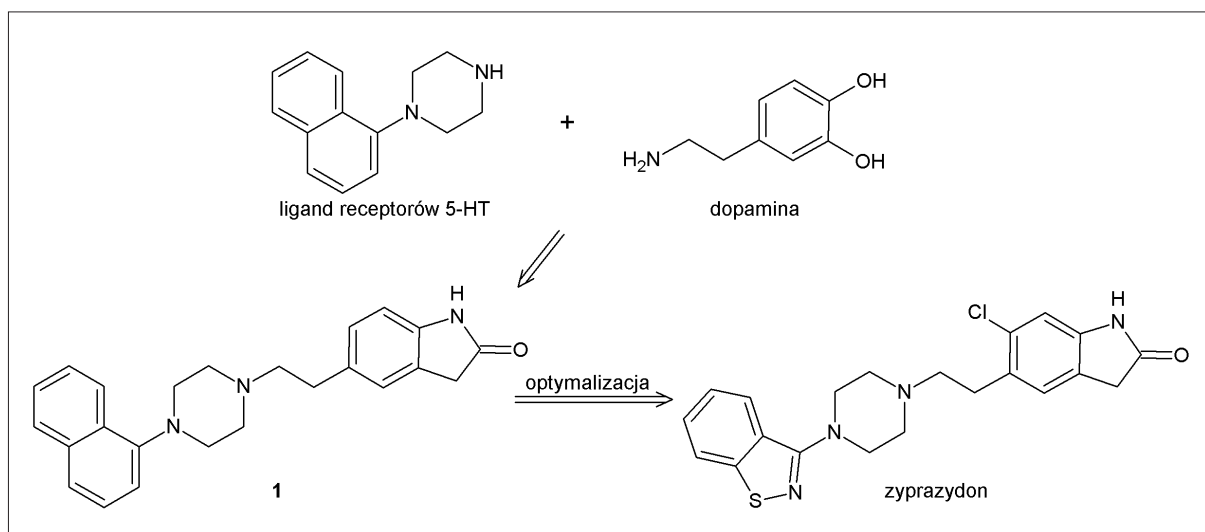
Łączniki wykorzystywane do łączenia dwóch fragmentów cząsteczek mogą być w warunkach metabolizmu w ustroju trwałe lub też zaprojektowane tak, by pod wpływem enzymów ulegać rozszczepieniu prowadzącemu do uwolnienia dwóch cząsteczek, mogących działać następnie niezależnie od siebie na odrębne cele biologiczne. Jako trwałe łączniki stosuje się łańcuchy alkilowe lub fragmenty arylowe, które mogą również być elementem odpowiedzialnym za dodatkową lub zwiększoną aktywność całej cząsteczki. Łączniki „degradowalne” najczęściej opierają się na wiązaniu estrowym, które w warunkach ustrojowych jest łatwo hydrolizowane przez obecne w osoczu esterazy [25,32]. Przykłady związków wielofunkcyjnych zaprojektowanych z wykorzystaniem łączników omówiono w dalszej części artykułu, w rozdziale poświęconym ligandom wielofunkcyjnym w leczeniu choroby Alzheimera.

Za szczególnie interesujące można uznać ligandy wielofunkcyjne „zrośnięte, stopione” i „przenikające się, zmieszane”, których cząsteczki mają wspólne części odpowiedzialne za aktywność, a ich struktura powstaje w wyniku wykorzystania fragmentów farmakoforowych. Otrzymanie takich związków hybrydowych pozwala nie tylko poprawić ich aktywność, ale także korzystnie wpłynąć na parametry farmakokinetyczne, zbliżone do wykazywanych przez stosowane w terapii leki [2]. Przykładem leku stosowanego obecnie w terapii, który został zaprojekto-

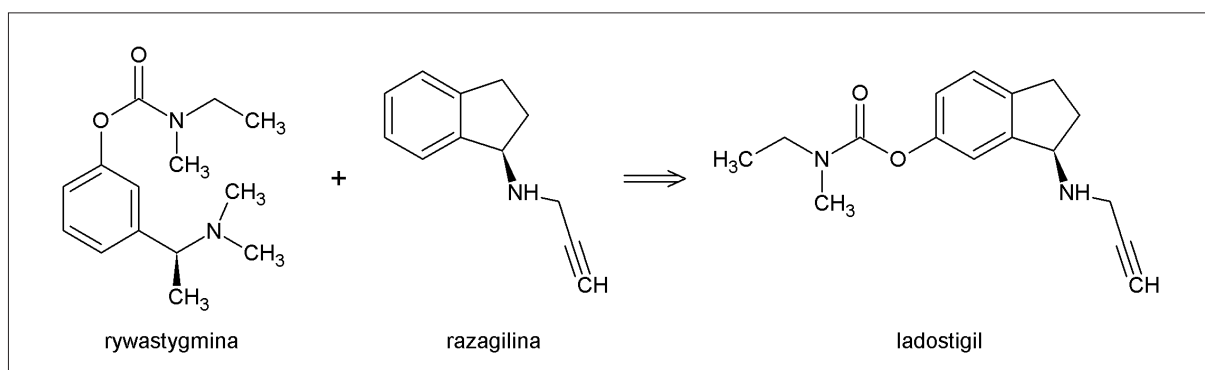
wany z wykorzystaniem koncepcji leków wieloligandowych, jest zyprazydon, odkryty przez naukowców z firmy Pfizer. Związek jest stosowany w schizofrenii, która wiąże się z zaburzeniami przekazywania dopaminergicznego, zwłaszcza ze zwiększoną aktywnością dopaminergiczną w szlaku mezolimbicznym. Blokowanie receptorów D_2 przez stosowanie antagonistów tych receptorów od lat jest podstawową strategią w leczeniu schizofrenii [24]. Pierwszą grupą leków stosowanych w leczeniu chorych schizofreników byli selektywni antagoniści receptorów D_2 , np. haloperydol, wykazujący działanie na objawy pozytywne (np. urojenia), bez wpływu na objawy negatywne, takie jak np. wycofanie społeczne. Stosowanie haloperydolu powodowało wystąpienie tzw. objawów pozapiramidowych (EPS, extrapyramidal syndrome), objawiające się zaburzeniami motoryki ciała. W przeciwieństwie do haloperydolu, klopazyna, zaliczana do tzw. atypowych leków przeciwpsychotycznych, nie wywołuje objawów pozapiramidowych, jednocześnie działając zarówno na objawy pozytywne jak i negatywne schizofrenii [25]. Atypowe leki przeciwpsychotyczne cechuje zdolność do blokowania zarówno receptorów $5-HT_2$ jak i D_2 . Zgodnie z jedną z teorii tłumaczących działanie atypowych leków przeciwpsychotycznych, wysoki stosunek aktywności $5-HT_2/D_2$ odpowiada za ich „atypowość”. Antagonizm w stosunku do receptorów $5-HT_2$ może zwiększać neurotransmisję dopaminergiczną w szlaku nigrostriatalnym, zmniejszając tym samym ryzyko wystąpienia objawów pozapiramidowych [24]. Wspomniany wcześniej zyprazydon, należący do atypowych leków przeciwpsychotycznych, został zaprojektowany przez połączenie endogennego agonisty receptora D_2 , dopaminy, z dużym, lipofilowym ugrupowaniem antagonisty receptora $5-HT_2$, 1-naftylopiperyzyny. Takie połączenie umożliwiło zmianę aktywności agonistycznej dopaminy wobec receptora D_2 w aktywność antagonistyczną, niezbędną w schizofrenii [25]. Na rycinie 2 przedstawiono schemat sposobu projektowania cząsteczki zyprazydonu.

W procesie optymalizacji strukturę oznaczoną na ryc. 2 numerem 1, będącą ligandem receptorów $5-HT$ i dopaminergicznych [30], poddano modyfikacji polegającej na zamianie grupy naftylowej na ugrupowanie 1,2-benzotiazolu oraz wprowadzenie atomu chloru w pozycji 6 pierścienia 2,3-dihydroindol-2-onu. Zyprazydon można uznać za „zrośnięty” typ liganda wielofunkcyjnego, ze względu na nakładanie się wyjściowych cząsteczek wyłącznie w miejscu jednego atomu azotu [25].

Cząsteczka ladostigilu (TV-3326), zaprojektowana jako potencjalny lek na otępienie i depresję towarzyszące chorobom neurodegeneracyjnym, jest dwufunkcyjnym ligandem typu „przenikającego się” (ryc. 3). W cząsteczce występują podstawowe dla aktywności elementy strukturalne rywastygminy i razagiliny (Azilect®), odpowiednio fragment karbaminianowy i aminoindanowy [2]. Rywastygmina, znany lek stosowany w terapii choroby Alzheimera (AD, Alzheimer's disease), jest inhibitorem cholinesteraz: acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy. Związek ten w świetle badań naukowych wpły-



Ryc. 2. Projektowanie liganda dwufunkcyjnego na przykładzie zypyrydonu [14]



Ryc. 3. Ladostigil jako przykład liganda „przenikającego się” [10]

wa korzystnie na zaburzenia zachowania u pacjentów z AD lub otępieniem z ciałami Lewy’ego (DLB, dementia with Lewy bodies) [42]. Razagilina jest nowym lekiem stosowanym w leczeniu chorych z chorobą Parkinsona (PD, Parkinson’s disease), a jej działanie polega na nieodwracalnym blokowaniu monoaminooksydazy, głównie jej odmiany B (MAO-B). W odróżnieniu od rywastygminy wykazuje także właściwości neuroprotektoryjne, wynikające z jego zdolności do aktywacji enzymów antyoksydacyjnych (takich jak dysmutaza ponadtlenkowa) oraz zapobiegania spadkowi potencjału błonowego w mitochondriach, powodowanego przez reaktywne formy tlenu w warunkach stresu oksydacyjnego [42,43]. Za działanie odpowiada ugrupowanie propargilowe [43]. Ladostigil zawiera w swojej strukturze ugrupowanie karbaminianowe pochodzące od rywastygminy, odpowiedzialne za zdolność do hamowania cholinesteraz, które wprowadzono w pozycję 6 pierścienia aminoindanowego razagiliny. Powstały ligand dwufunkcyjny łączy w sobie aktywność charakterystyczną dla rywastygminy i razagiliny. Hamuje cholinesterazy, działa neuroprotektoryjnie dzięki obecności ugrupowania propargilowego, a przez hamowanie zarówno MAO-B jak i MAO-A, ma właściwości przeciwd-

presyjne, aczkolwiek jest słabszym inhibitorem MAO-B w porównaniu z razagiliną [42].

STRATEGIA WYKORZYSTUJĄCA BADANIA PRZESIEWOWE

Omówiona dotąd strategia projektowania leków wieloligandowych, oparta na wiedzy, polegała na tworzeniu struktur hybrydowych ze związków o znanej aktywności biologicznej. W strategii wykorzystującej badania przesiewowe, biblioteki związków są poddawane testom oceniającym ich aktywność wobec wybranych celów biologicznych, co pozwala na znalezienie odpowiedniego kandydata, cechującego się pożądanym profilem farmakologicznym. Ze względu na rodzaj badanych bibliotek można wyróżnić dwa podejścia, które omówiono niżej. W rozważaniach przyjęto, że poszukiwany lek ma wykazywać aktywność wobec dwóch celów molekularnych: A i B.

Badaniu przesiewowemu można poddać bibliotekę składającą się z dużej liczby bardzo różnorodnych, wcześniej zsyntetyzowanych związków. Poszukiwanie związków aktywnych prowadzi się w oparciu o wysokosprawne badanie przesiewowe (HTS, high-throughput screening) wobec

Tabela 1. Porównanie dwóch głównych strategii projektowania ligandów wielofunkcyjnych. Opracowano na podstawie [10]

Strategia oparta na wiedzy	Strategia wykorzystująca badania przesiewowe
Umożliwia przeważnie stworzenie tylko ligandów dwufunkcyjnych	Pozwala na otrzymanie ligandów wielofunkcyjnych, działających na więcej niż dwa cele biologiczne
Wymaga znajomości selektywnych ligandów dla wybranych celów biologicznych	Może być zastosowana, gdy nie są znane selektywne ligandy
Możliwe jest znalezienie liganda wielofunkcyjnego wiążącego się do niespokrewnionych celów, których ligandy różnią się farmakoforami, poprzez połączenie tych ligandów łącznikiem	Istnieje niewielkie prawdopodobieństwo znalezienia odpowiedniej cząsteczki wiążącej się do niespokrewnionych celów, których ligandy różnią się farmakoforami
Utrzymanie aktywności liganda może być trudne przyłączeniu go z ligandem skierowanym na inny cel biologiczny	Ligand wyłoniony w badaniach przesiewowych jest wielofunkcyjny, ale jego aktywność wobec poszczególnych celów biologicznych może być niewielka
Otrzymane ligandy wielofunkcyjne mogą cechować się zbyt dużą masą cząsteczkową i niekorzystnymi parametrami farmakokinetycznymi	Wyłonione w badaniach ligandy wielofunkcyjne cechują się często korzystnymi właściwościami fizykochemicznymi i farmakokinetycznymi

wybranych celów biologicznych A i B, po czym związki porządkuje się zgodnie z ich aktywnością [27].

W celowanym badaniu przesiewowym (focused screening) związki, które są znane z aktywności wobec jednego z celów biologicznych, np. A, są badane pod kątem aktywności wobec celu B. Niewielka aktywność wobec B nie oznacza od razu, że związek taki nie może stać się ligandem dwufunkcyjnym, gdyż możliwe jest wprowadzenie pewnych modyfikacji strukturalnych na podstawie znajomości selektywnych ligandów B, które zapewnią związkowi silniejsze wiązanie do B [27].

Wyłonione w badaniach HTS lub focused screening najbardziej aktywne związki przechodzą do fazy „związek aktywny – struktura wiodąca” (hit-to-lead), w której ich struktury są optymalizowane.

W tabeli 1 przedstawiono porównanie omówionych strategii projektowania ligandów wielofunkcyjnych.

Warto jeszcze wspomnieć o strategii selektywnej optymalizacji działań niepożądanych leku (SOSA, selective optimization of side activities), która może być wykorzystana w poszukiwaniu ligandów wielofunkcyjnych [12]. Większość stosowanych obecnie w terapii leków wykazuje działania niepożądane, będące skutkiem ich oddziaływania z innymi celami biologicznymi, często niezwiązanymi z głównym celem molekularnym leku. Zdolność wiązania leku z innymi celami biologicznymi, zwaną aktywnością uboczną (side activity), można wykryć w badaniach przesiewowych. W metodzie SOSA uboczną aktywność leku w procesie optymalizacji przekształca się w aktywność główną, z jednoczesnym zmniejszeniem lub całkowitym usunięciem pierwotnej aktywności. Ogromną zaletą podejścia SOSA jest to, że wykorzystywanymi w tej metodzie związkami wyjściowymi są leki o znanej biodostępności i toksyczności, co zwiększa szansę na otrzymanie pochodnych o właściwościach lekopodobnych (drug-like properties). Jako przykład może posłużyć przekształcenie minapryny, stosowanego niegdyś

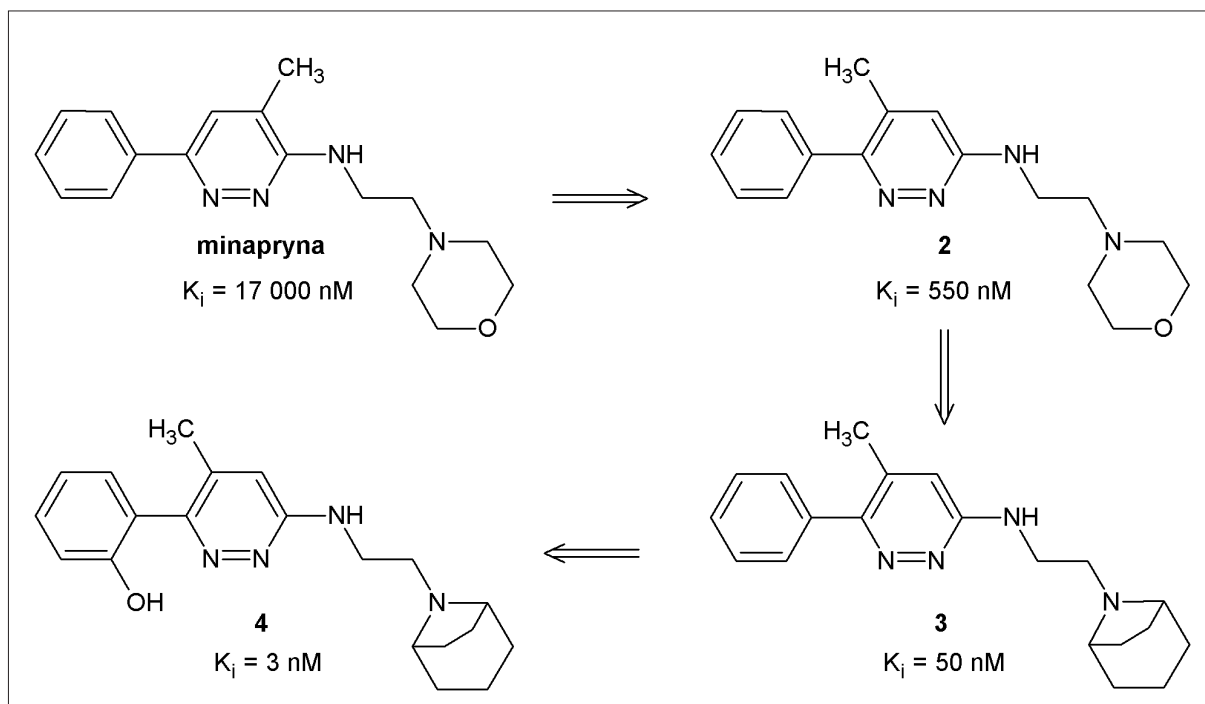
leku przeciwdepresyjnego o działaniu dopaminergicznym, który jest także częściowym agonistą receptorów muskarynowych M_1 , jednak z bardzo niewielkim powinowactwem. Przedstawione na ryc. 4 modyfikacje struktury minapryny doprowadziły do wzrostu powinowactwa do receptorów M_1 z 17 μM do 3 nM.

Dokonane modyfikacje, polegające na zmianie położenia grupy metylowej, zamianie pierścienia morfolinowego na tropanowy oraz wprowadzeniu grupy hydroksylowej do podstawnika fenyloвого, doprowadziły do całkowitego zniesienia aktywności dopaminergicznej i silnego wzrostu powinowactwa do receptorów M_1 [40].

Podejście SOSA umożliwia wykorzystanie obecnie lub niegdyś stosowanych leków w poszukiwaniu nowego środka terapeutycznego działającego na inne cele molekularne. Punktem wyjścia jest określenie ubocznych aktywności znanego leku, co w dobie powszechnego stosowania wysokosprawnych badań przesiewowych stanowi nieodłączny element określenia potencjalnych skutków ubocznych w testach *in vitro*. Choć przytoczony przykład modyfikacji minapryny ilustruje całkowite zniesienie pierwotnej aktywności z jednoczesnym nasileniem aktywności ubocznej, można jednak wyobrazić sobie zastosowanie strategii SOSA w poszukiwaniach ligandów wielofunkcyjnych. Głównym etapem byłoby wówczas zidentyfikowanie wśród leków działających na jeden z pożądaných celów biologicznych takich, które wykazują uboczną aktywność wobec innego, również pożądanego celu molekularnego. Selektywna optymalizacja ubocznej aktywności, prowadzona w taki sposób, by nie zmniejszyć znacznie głównej aktywności, mogłaby doprowadzić do uzyskania nowego leku, działającego w równomierny sposób na dwa cele biologiczne.

PARAMETRY FIZYKOCHEMICZNE W PROJEKTOWANIU LIGANDÓW WIELOFUNKCYJNYCH

Właściwości fizykochemiczne związków projektowanych jako potencjalne leki mają podstawowe znaczenie



Ryc. 4. Podejście SOSA zastosowane do minapryny, mające na celu zwiększenie powinowactwa do receptorów M_1 . Opracowano na podstawie [17]

dla możliwości wykazania aktywności farmakologicznej *in vivo* przez te związki. Projektowanie ligandów wielofunkcyjnych jest obarczone szczególnym ryzykiem otrzymania struktur o dużej masie cząsteczkowej i niekorzystnym profilu farmakokinetycznym, który może skutkować brakiem aktywności biologicznej w badaniach *in vivo*. Masa cząsteczkowa jest ważnym parametrem fizykochemicznym, ponieważ bardzo często koreluje z takimi właściwościami cząsteczki jak: lipofilowość, powierzchnia polarna (PSA, polar surface area), czy liczba donorów bądź akceptorów wiązań wodorowych [31].

W literaturze można znaleźć opis badań, w których podano analizie porównawczej właściwości znanych leków oraz wybranych ligandów wielofunkcyjnych. Wyniki analiz wskazują, że średnia masa cząsteczkowa i złożoność struktury jest większa w przypadku ligandów wielofunkcyjnych [26]. Duża masa cząsteczkowa związku może natomiast wpływać na zwiększenie jego lipofilowości oraz często toksyczności.

Badania na temat właściwości fizykochemicznych ligandów wielofunkcyjnych na tle tradycyjnych leków opisują Morphy i Rankovic [28]. Z ich badań wynika, że na właściwości zoptymalizowanych ligandów wielofunkcyjnych mają wpływ dwa podstawowe czynniki: rodzaj celu molekularnego dla poszukiwanych ligandów oraz zastosowana strategia projektowania. Celami molekularnymi, dla których osiągnięcie korzystnej aktywności *in vitro* wraz z odpowiednim profilem farmakokinetycznym jest najtrudniejsze, są receptory sprzężone z białkiem G, dla których endogennymi ligandami są

peptydy (peptide GPCRs). Jeśli chodzi o pozostałe cele biologiczne, które brano pod uwagę w badaniach, m.in. oksydazy, proteazy czy białka transportujące, rozmiary cząsteczek DML oraz klasycznych leków były zbliżone. Autorzy formułują hipotezy tłumaczące taki stan rzeczy, powołując się na podobieństwo miejsc wiążących w obrębie wybranych kombinacji potencjalnych celów biologicznych, które ułatwia tworzenie wielofunkcyjnych ligandów o wysokim stopniu przenikania się. Innym ważnym czynnikiem wpływającym na właściwości projektowanych ligandów wielofunkcyjnych jest dostępność danych biostrukturalnych na temat wybranych celów biologicznych [28].

Pozostaje jeszcze odpowiedź na pytanie, w jaki sposób projektować ligandy wielofunkcyjne, by zapobiec otrzymywaniu struktur o niekorzystnych parametrach fizykochemicznych. W przypadku stosowania strategii, w której łączy się selektywne ligandy w jedną cząsteczkę, niezmiernie ważne jest, by wyjściowe ligandy cechowały się odpowiednimi właściwościami fizykochemicznymi. Spośród strategii opartych na wiedzy, prawdopodobieństwo uzyskania najlepszych wyników zapewnia tworzenie „przenikających się” ligandów wielofunkcyjnych [26]. Podejście wykorzystujące badania przesiewowe również z dużym prawdopodobieństwem może dostarczyć cząsteczek o właściwościach lekopodobnych, jeśli tylko punktem wyjścia były związki mające takie właściwości. Warto dodać, że omawiany problem dużej masy cząsteczkowej ligandów wielofunkcyjnych stanowi ograniczenie tylko w przypadku doustnego podania środka terapeutycznego. Większe cząsteczki mogą być bowiem z powodzeniem podawane drogą dożylną [28].

POSZUKIWANIE LIGANDÓW WIELOFUNKCYJNYCH W LECZENIU CHOROBY ALZHEIMERA

Choroba Alzheimer – zarys patofizjologii

Choroba Alzheimer, opisana po raz pierwszy ponad 100 lat temu, jest najczęstszym rodzajem zespołu otępienne-go, związanego z nieodwracalnymi procesami neurodege-neracyjnymi w mózgu. Choroba jest śmiertelna, a szacun-kowa liczba osób chorujących na nią w 2013 r. w Stanach Zjednoczonych wyniosła 5,2 miliona. Na schorzenie to cierpi co dziewiąta osoba po 65 roku życia i co trzecia po 85 roku życia, z czego prawie 2/3 chorych w USA stano-wią kobiety [1].

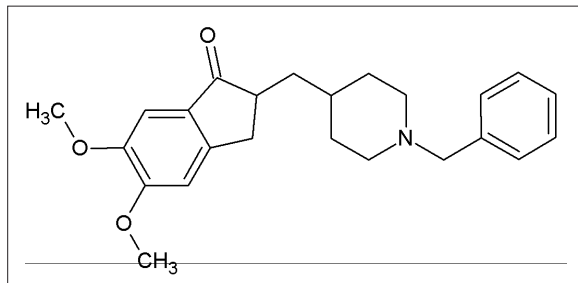
Najczęstszą postacią choroby Alzheimer jest tzw. postać sporadyczna. Jej dokładne przyczyny są wciąż nieznane, przyjmuje się jednak, że rozwój choroby wiąże się ze starzeniem oraz złożoną interakcją czynników środowisko-wych i genetycznych [3]. U osób chorych, w obszarach mózgu odpowiedzialnych za pamięć i procesy poznawcze, dochodzi do powstawania tzw. blaszek starczych będących zewnątrzkomórkowymi zło-gami β -amyloidu oraz umiej-scowionych wewnątrz neuronów spletków neurofibrylar-nych, tworzonych przez hiperfosforylowane białko τ [4].

Beta amyloid ($A\beta$) jest peptydem o długości 40 lub 42 ami-nokwasów, powstającym przez cięcie transmembranowe-go białka prekursorowego $A\beta$ (amyloid precursor protein, APP) kolejno przez dwa enzymy: β -sekre-tazę (BACE-1) i γ -sekre-tazę. Monomeryczny beta amyloid ulega poli-meryzacji z utworzeniem krótkich i rozpuszczalnych oli-gomerów, które następnie ulegają dalszej polimeryzacji tworząc: protofibryle i duże, nierozpuszczalne fibryle. Te ostatnie wcho-dzą w skład blaszek starczych. Ponad dwie dekady temu zaproponowano tzw. hipotezę kaska-dy amyloidowej, tłumaczącą w jaki sposób beta amyloid przyczynia się do zmian neurodegeneracyjnych. Hipoteza ulegała pewnym modyfikacjom, wobec coraz to nowych faktów doświadczalnych. Na początku sądzono bowiem, że za neuro- i synaptotoksyczność odpowiadają nieroz-puszczalne fibryle beta amyloidu. Zgodnie z najnowszymi poglądami za wspomnianą toksyczność mogą odpowiadać rozpuszczalne oligomery. Jak już wspomniano, oprócz blaszek starczych, do typowych zmian patologicznych w przebiegu choroby Alzheimer zalicza się spletki neu-rofibrylarne, tworzone przez hiperfosforylowane białko τ . W warunkach fizjologicznych białka tau są związane z mikrotubulami, stabilizując je i uczestnicząc w trans-porcie aksonalnym [8,9,14,15].

Cele biologiczne oraz leki w chorobie Alzheimer

W przebiegu choroby Alzheimer dochodzi do zmian w obrębie neuronów cholinergicznycch części podstawnej kresomózgowia, polegających na zmniejszeniu przekaż-nictwa nerwowego. Od wielu lat tradycyjnym podejściem terapeutycznym jest zwiększanie stężenia acetylocho-li-ny w układzie cholinergicznym OUN, przez blokowanie acetylocholinoesterazy (AChE), enzymu rozkładającego

acetylocholiny. Do obecnie stosowanych w leczeniu AD ośrodkowych inhibitorów acetylocholinoesterazy można zaliczyć rywastygminę, galantaminę oraz donepezil, któ-rego wzór strukturalny przedstawiono na ryc. 5.



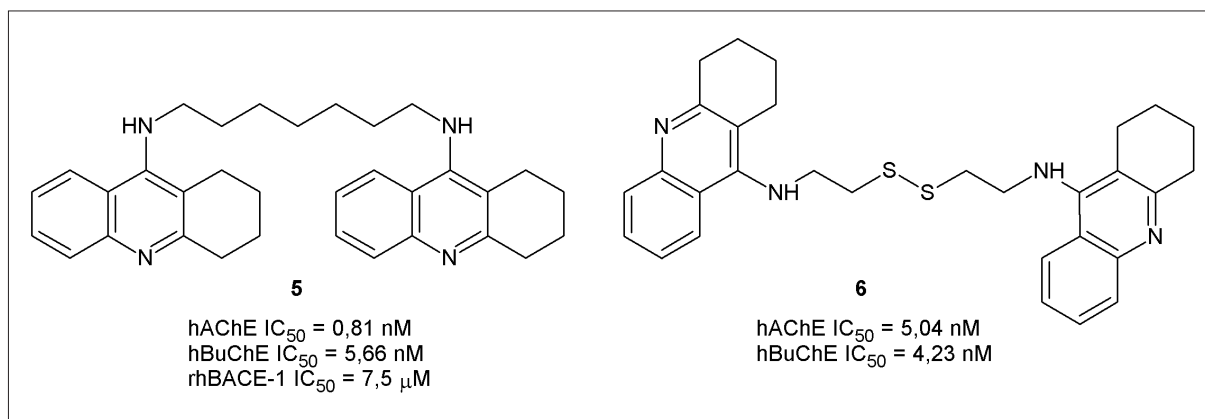
Ryc. 5. Struktura cząsteczki donepezilu

Warto zauważyć, że leki te są nie tylko selektywnymi in-hibitorami AChE, ale również mają inne korzystne wła-sciwości. Rywastygmina hamuje także butyrylocho-li-noesterazę (BuChE), drugi enzym zdolny do hydrolizy acetylocholiny, którego stężenie w mózgu wzrasta w prze-biegu choroby Alzheimer, a jego rola dokładnie nie jest jeszcze poznana [20]. Galantamina ma szerszy profil dzia-łania, będąc odwracalnym kompetycyjnym inhibitorem AChE jest także allosterycznym modulatorem receptorów nikotynowych [20]. Donepezil selektywnie hamuje AChE, jest także umiarkowanym inhibitorem β -amyloidu oraz β -sekre-tazy (BACE1), tj. enzymu odpowiedzialnego za syn-tezę β -amyloidu. Ponadto donepezil oddziałuje także z re-ceptorami sigma-1 (σ -1), które mają wpływ na aktywność przeciwnowotworczą [21].

Oprócz wymienionych inhibitorów AChE, w terapii AD stosuje się także memantynę, będącą niekompetycyjnym antagonistą receptora kwasu *N*-metylo-*D*-asparaginowego (NMDA). Receptor NMDA wraz z jego endogennym ago-nistą, glutaminianem, należy do układu glutaminergicz-nego, którego nadmierne pobudzenie w chorobie Alzhei-mera prowadzi do ekscytotoksyczności i śmierci komórek nerwowych [3,4,19]. Obecnie w standardowej terapii cho-roby Alzheimer zaleca się połączenie inhibitora AChE z memantyną [34,41].

Wszystkie z wymienionych wyżej leków działają jedynie objawowo: galantamina, rywastygmina oraz donepezil zwiększają przewodnictwo cholinergiczne, a memantyna zmniejsza ekscytotoksyczność glutaminianu. Mimo coraz lepszej znajomości patofizjologii choroby Alzheimer, jak dotąd nie udało się otrzymać związku, który pozwoliłby na leczenie przyczynowe AD, modyfikujące przebieg cho-roby [3]. Niżej przedstawiono wybrane strategie terapeutyczne, którymi kierują się obecnie badacze, poszukując nowych leków na chorobę Alzheimer.

Powszechnie akceptowana hipoteza kaskady amyloidowej wyznacza od wielu lat kierunek poszukiwania nowych leków. Proponowane przez badaczy strategie terapeutyczne



Ryc. 6. Homodimery takryny. 5: bis(7)takryna, 6: dimer takryny połączony linkerem cystaminowym

tyczne związane z beta amyloidem obejmują: hamowanie powstawania lub blokowanie agregacji Aβ, aktywowanie degradacji Aβ, immunoterapia skierowana przeciwko Aβ oraz hamowanie procesów zapalnych towarzyszących blaszkom starczym. Hamowanie tworzenia beta amyloidu można osiągnąć przez hamowanie γ- lub β-sekretazy (BACE-1). Uwzględniając to, że u chorych na sporadyczną postać AD występuje podwyższona aktywność BACE-1, hamowanie tego enzymu wydaje się szczególnie uzasadnione. W literaturze opisano przykłady związków o aktywności hamującej β-sekretazę. W badaniach klinicznych III fazy (www.clinicaltrials.gov) znajdują się cztery leki o takim mechanizmie działania. Aktywowanie degradacji beta amyloidu wymagałoby zaprojektowania aktywatorów enzymów odpowiedzialnych za degradację Aβ, np. neprylizyny lub związków umożliwiających usuwanie Aβ z mózgu przez aktywację kanałów regulujących napływ oraz odpływ Aβ. W badaniach nad przebiegiem AD odkryto, że blaszkom starczym towarzyszą procesy zapalne. Są związane z aktywowanym mikroglejem, który wydziela mediatory reakcji zapalnej, takie jak prostaglandyny i cytokiny. Na tej podstawie zaproponowano, by w leczeniu AD stosować leki przeciwzapalne. Za takim podejściem przemawia również obserwacja, że u pacjentów cierpiących na zapalenie stawów i stosujących niesteroidowe leki przeciwzapalne choroba Alzheimerera występuje rzadziej [4].

Oprócz blaszek starczych, ważnym objawem AD jest obecność wewnątrz neuronów splątków neurofibrilarnych, tworzonych przez hiperfosforylowane białko τ. Jako potencjalne sposoby terapii, związane z białkiem τ, rozważa się hamowanie jego hiperfosforylacji oraz agregacji. By zapobiegać hiperfosforylacji białka τ konieczne jest określenie kinazy odpowiedzialnej za ten proces, co jak dotąd nie udało się naukowcom [4].

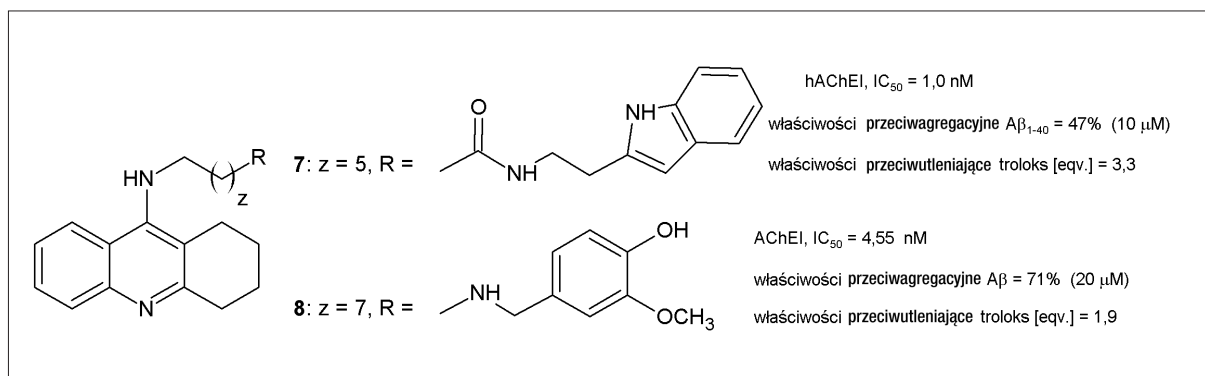
WYBRANE LIGANDY WIELOFUNKCYJNE JAKO POTENCJALNE LEKI W AD

Koncepcja ligandów wielofunkcyjnych cieszy się ogromnym zainteresowaniem wśród badaczy poszukujących leków na chorobę Alzheimerera, gdyż ich wielokierunko-

we działanie pozwoliłoby na skuteczne leczenie nie tylko objawów, ale także i przyczyn tego złożonego schorzenia. Najczęściej stosowaną w ośrodkach akademickich strategią projektowania ligandów wielocelowych jest podejście oparte na wiedzy. W licznych projektach badawczych łączy się farmakofory inhibitorów cholinesteraz z fragmentami odpowiedzialnymi za hamowanie β-sekretazy (zob. wyżej), zapobieganie agregacji beta amyloidu (zob. wyżej) lub działającymi jako przeciwutleniacze [11]. Niżej przedstawiono wybrane ligandy wielofunkcyjne, otrzymane przez różne zespoły, których wielokierunkowe działanie zostało udowodnione w testach *in vitro*.

Takryna, czyli 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakrydyna, była pierwszym lekiem stosowanym w chorobie Alzheimerera. Lek jednak wycofano z powodu jego hepatotoksyczności, jest jednak obiektem zainteresowania w projektowaniu ligandów wielocelowych ze względu na właściwości. Związek jest inhibitorem acetylo- i butyrylocholinesterazy, a także zapobiega tworzeniu reaktywnych form tlenu oraz fosforylacji tubuliny i białek związanych z mikrotubulami. Wśród zsyntetyzowanych pochodnych takryny o działaniu wielocelowym można wymienić m.in. związki o budowie homo- i heterodimerycznej. Homodimery takryny są zbudowane z dwóch reszt 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakrydyny, połączonych za pomocą łącznika. Przykładami homodimerów są bis(7)takryna 5 oraz dimer takryny połączony łącznikiem cystaminowym 6, przedstawione na ryc. 6.

Bis(7)takryna 5 jest inhibitorem acetylocholinesterazy, który dzięki budowie może oddziaływać zarówno z miejscem aktywnym (CAS, catalytic active site), jak i peryferyjnym miejscem wiązania (PAS, peripheral anionic site) [17]. Wiązanie ligandów do PAS jest szczególnie korzystne, gdyż miejsce to przyczynia się do agregacji beta amyloidu i tym samym tworzenia blaszek starczych [22]. Oprócz oddziaływania z PAS, bis(7)takryna 5 w testach *in vitro* wykazuje także zdolność do hamowania ludzkiej β-sekretazy, co pozwala na zaklasyfikowanie tego związku do wielofunkcyjnych ligandów zdolnych zapobiegać powstawaniu i agregacji beta amyloidu. Związek wyka-



Ryc. 7. Heterodimeryczne pochodne takryny [34]

zuje także właściwości neuroprotektoryjne [7,17,22,39]. Zastąpienie siedmiowęglowego łącznika w bis(7)takrynie 5 łącznikiem cystaminowym pozwoliło na otrzymanie homodimerycznej pochodnej 6, wykazującej mniejszą toksyczność niż bis(7)takryna. Związek 6 jest inhibitorem acetylo- i butyrylocholinoesterazy w zakresie nanomolowych stężeń, zapobiega agregacji beta amyloidu a także - w przeciwieństwie do bis(7)takryny 5 - chroni przed uszkodzeniami wywoływanymi przez nadtlenek wodoru [22,23].

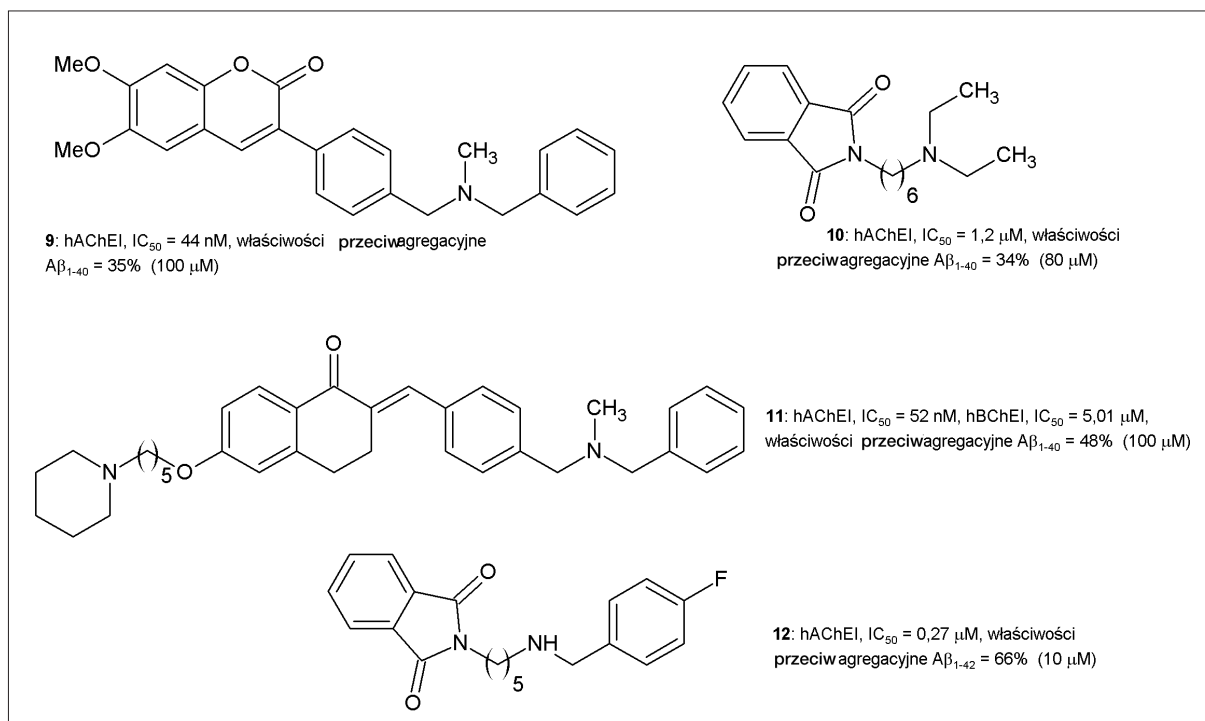
W strukturze heterodimerycznych pochodnych takryny można wyróżnić fragment 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakrydyny, połączony za pomocą łącznika z fragmentem innej cząsteczki. Przykłady takich pochodnych przedstawiono na ryc. 7.

Przedstawiony związek 7 to połączenie takryny z fragmentem indolowym, charakterystycznym m.in. dla melatoniny. Wykazuje szeroki profil działania, obejmujący m.in. zdolność do hamowania ludzkiej acetylocholinoesterazy, a także właściwości przeciwutleniające oraz zapobiegające agregacji beta amyloidu. Wykonane dla tego związku modelowanie molekularne ujawniło jego zdolność do jednoczesnego oddziaływania z centrum aktywnym acetylocholinoesterazy (przez fragment takryny) oraz z peryferyjnym miejscem wiązania. Podstawą wiązania związku 7 z PAS są oddziaływania π - π pierścienia indolowego z pierścieniami aromatycznymi aminokwasów: tyrozyny 72 i tryptofanu 286 (Tyr72, Trp286) ludzkiej acetylocholinoesterazy. Związek oznaczony numerem 8 wykazuje podobne właściwości jak związek 7, jest jednak silniejszym przeciwutleniaczem, ze względu na obecność grupy fenolowej. Grupa ta odpowiada także za wiązanie heterodimeru 8 z PAS acetylocholinoesterazy drętwy kalifornijskiej, dzięki tworzeniu wiązań wodorowych z resztą argininy 289. Heterodimer 8 jest jedną z wielu pochodnych takryny połączonych łącznikiem alkiloaminowym z pierścieniem fenylovym mającym podstawniki zawierające atomy tlenu. Ugrupowania takie są odpowiedzialne za zdolność do hamowania agregacji beta-amyloidu [6,18,22].

W literaturze znajduje się wiele przykładów ligandów wielofunkcyjnych opartych na strukturze stosowanego obecnie w terapii AD donepezilu. Lek jest inhibitorem ace-

tylocholinoesterazy, zdolnym do oddziaływania zarówno z miejscem aktywnym, jak i peryferyjnym miejscem wiązania. Ma słabe działanie zapobiegające agregacji beta amyloidu wywołanej przez acetylocholinoesterazę [39]. Na ryc. 8 przedstawiono wzory kilku pochodnych, strukturalnie zbliżonych do donepezilu, które zaprojektowano i zsyntetyzowano jako potencjalne ligandy wielofunkcyjne.

Wśród tych związków na uwagę zasługuje pochodna oznaczona numerem 11, gdyż oprócz zdolności do hamowania agregacji beta amyloidu, jest inhibitorem zarówno acetylo- jak i butyrylocholinoesterazy. Przeprowadzone modelowanie molekularne ujawniło ważną rolę pięciowęglowego łącznika z pierścieniem piperydynowym dla oddziaływania z resztą tryptofanu 286 w peryferyjnym miejscu wiązania acetylocholinoesterazy [33,39]. Innym związkiem, którego struktura została oparta na budowie cząsteczki donepezilu jest związek 10 oraz jego pochodne, w których główną rolę pełni układ ftalimidu oraz fragment alkildyetyloaminowy. Ten pierwszy, podobnie do ugrupowania indan-1-onu cząsteczki donepezilu, zaplanowano jako fragment zdolny do oddziaływania z peryferyjnym miejscem wiązania acetylocholinoesterazy, a ugrupowanie alkildyetyloaminowe zostało pomyślane jako ligand dla centrum aktywnego AChE. W badaniach aktywności pochodne o takiej strukturze okazały się selektywnymi inhibitorami acetylocholinoesterazy; ich zdolność do hamowania butyrylocholinoesterazy była niewielka (dla związku 10: 26,8% hamowania przy stężeniu $100 \mu M$). Wielocelowe działanie związku 10 przejawia się w jego zdolności do wiązania zarówno z centrum aktywnym jak i peryferyjnym miejscem wiązania w acetylocholinoesterazie. Jak wykazało modelowanie molekularne, za wiązanie z centrum aktywnym odpowiadają oddziaływania typu π -kation dodatnio naładowanego atomu azotu sprotonowanej grupy dietyloaminowej z aminokwasami aromatycznymi miejsca anionowego (Phe330, Phe331 oraz Trp84 [numeracja dla AChE z drętwy kalifornijskiej]). Wiązanie z peryferyjnym miejscem wiązania jest wynikiem oddziaływań π - π pierścienia aromatycznego ftalimidu z resztami tryptofanu 279 i tyrozyny 334 (numeracja dla AChE z drętwy kalifornijskiej). Wielofunkcyjność zaprojektowanych pochodnych ftalimidu wykazano również w teście agregacji $A\beta_{1-40}$, w którym związek



Ryc. 8. Przykłady ligandów wielofunkcyjnych opartych na strukturze donepezilu [35,37]

10 był silniejszym inhibitorem agregacji niż referencyjny donepezil [13]. Niedawno opisano także serie analogów związku **10**, zaprojektowanych metodami modelowania molekularnego, w których zamieniono fragment dietyloaminowy na *N*-benzyloaminowy z różnymi podstawnikami [10]. W tej nowej serii pochodnych uzyskano związki o silniejszej aktywności hamującej AChE, porównywalnej do donepezilu. Najbardziej interesujący związek **12** był selektywnym inhibitorem AChE, ponadto hamował agregację $A\beta$ w 65,9% przy stężeniu 10 μ M. Dodatkowe badania wykazały także jego działanie neuroprotekcyjne w stężeniu 1 i 3 μ M w testach cytotoksyczności wywołanej $A\beta_{1-42}$ mierzonej na liniach komórkowych SH-SY5Y.

PODSUMOWANIE

Projektowanie i odkrywanie nowych leków zazwyczaj odbywa się w firmach farmaceutycznych. Jednak niebagatelny udział w tych procesach mają także ośrodki akademickie prowadzące samodzielnie projekty badawcze lub też

współpracujące z firmami farmaceutycznymi, szczególnie na dalszym etapie badań rozwoju leku, tj. fazie badań klinicznych [36]. Proces odkrywania i rejestracji nowego leku to obecnie długa droga, trwająca prawie 10-15 lat. Z tego względu poszukuje się nowe rozwiązania, mające na celu skrócenie tego czasu oraz ograniczenie kosztów różnych etapów rozwoju leku. Przedstawiona w artykule strategia projektowania liganda wielofunkcyjnego stanowi ciekawą alternatywę dla innych znanych i stosowanych metod odkrywania nowego leku. Wydaje się, że może być przydatna w poszukiwaniu skutecznej farmakoterapii nieuleczalnej obecnie choroby Alzheimera, schorzeniu o złożonych mechanizmach i wielu czynnikach mających wpływ na jego powstawanie. Ze względu na fakt, iż od 2003 r. nie został zarejestrowany żaden nowy lek w terapii tej ciężkiej choroby, podejmowanie różnych badań i poszukiwania nowych metod, jak np. opisana koncepcja leku wielofunkcyjnego, mogą się w przyszłości przyczynić do rozwiązania tego ważnego problemu.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Alzheimer's Association: 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.*, 2013; 9: 208-245
- [2] Bansal Y., Silakari O.: Multifunctional compounds: smart molecules for multifactorial diseases. *Eur. J. Med. Chem.*, 2014; 76: 31-42
- [3] Blennow K., de Leon M.J., Zetterberg H.: Alzheimer's disease. *Lancet*, 2006; 368: 387-403
- [4] Citron M.: Alzheimer's disease: strategies for disease modifica-

tion. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2010; 9: 387-398

- [5] Fareed J., Hoppensteadt D.A., Fareed D., Demir M., Wahi R., Clarke M., Adiguzel C., Bick R.: Survival of heparins, oral anticoagulants, and aspirin after the year 2010. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2008; 34: 58-73
- [6] Fernández-Bachiller M.I., Pérez C., Campillo N.E., Páez J.A., González-Muñoz G.C., Usán P., García-Palomero E., López M.G., Villarroya M., García A.G., Martínez A., Rodríguez-Franco M.I.: Tacrine-

-melatonin hybrids as multifunctional agents for Alzheimer's disease, with cholinergic, antioxidant, and neuroprotective properties. *Chem. Med. Chem.*, 2009; 4: 828-841

[7] Fu H., Li W., Luo J., Lee N.T., Li M., Tsim K.W., Pang Y., Youdim M.B., Han Y.: Promising anti-Alzheimer's dimer bis(7)-tacrine reduces β -amyloid generation by directly inhibiting BACE-1 activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 366: 631-636

[8] Gilbert B.J.: The role of amyloid β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Clin. Pathol.*, 2013; 66: 362-366

[9] Goedert M., Spillantini M.G.: A century of Alzheimer's disease. *Science*, 2006; 314: 777-781

[10] Guzior N., Bajda M., Skrok M., Kurpiewska K., Lewiński K., Brus B., Pišlar A., Kos J., Gobec S., Malawska B.: Development of multifunctional, heterodimeric isoindoline-1,3-dione derivatives as cholinesterase and β -amyloid aggregation inhibitors with neuroprotective properties. *Eur. J. Med. Chem.*, 2015; 92: 738-749

[11] Guzior N., Więckowska A., Panek D., Malawska B.: Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.*, 2015; 22: 373-404

[12] Hopkins A.L.: Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat. Chem. Biol.*, 2008; 4: 682-690

[13] Ignasik M., Bajda M., Guzior N., Prinz M., Holzgrabe U., Malawska B.: Design, synthesis and evaluation of novel 2-(aminoalkyl)-isoindoline-1,3-dione derivatives as dual-binding site acetylcholinesterase inhibitors. *Arch. Pharm.*, 2012; 345: 509-516

[14] Ittner L.M., Götz J.: Amyloid- β and tau - a toxic *pas de deux* in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2011; 12: 67-72

[15] Karran E., Mercken M., De Strooper B.: The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2011; 10: 698-712

[16] Korcsmáros T., Szalay M.S., Böde C., Kovács I.A., Csermely P.: How to design multi-target drugs: target search options in cellular networks. *Expert Opin. Drug Discov.*, 2007; 2: 799-808

[17] Li W., Mak M., Jiang H., Wang Q., Pang Y., Chen K., Han Y.: Novel anti-Alzheimer's dimer bis(7)-cognitin: cellular and molecular mechanisms of neuroprotection through multiple targets. *Neurotherapeutics*, 2009; 6: 187-201

[18] Luo W., Li Y.P., He Y., Huang S.L., Li D., Gu L.Q., Huang Z.S.: Synthesis and evaluation of heterobivalent tacrine derivatives as potential multi-functional anti-Alzheimer agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 2011; 46: 2609-2616

[19] Mangialasche F., Solomon A., Winblad B., Mecocci P., Kivipelto M.: Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol.*, 2010; 9: 702-716

[20] Marksteiner J., Schmidt R.: Treatment strategies in Alzheimer's disease with a focus on early pharmacological interventions. *Drugs Aging*, 2004; 21: 415-426

[21] Meunier J., Ieni J., Maurice T.: The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid β_{25-35} peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the σ_1 receptor. *Br. J. Pharmacol.*, 2006; 149: 998-1012

[22] Minarini A., Milelli A., Simoni E., Rosini M., Bolognesi M.L., Marchetti C., Tumiatti V.: Multifunctional tacrine derivatives in Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2013; 13: 1771-1786

[23] Minarini A., Milelli A., Tumiatti V., Rosini M., Simoni E., Bolognesi M.L., Andrisano V., Bartolini M., Motori E., Angeloni C., Hrelia S.: Cystamine-tacrine dimer: a new multi-target-directed ligand as potential therapeutic agent for Alzheimer's disease treatment. *Neuropharmacology*, 2012; 62: 997-1003

[24] Miyamoto S., Miyake N., Jarskog L.F., Fleischhacker W.W., Lieberman J.A.: Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical re-

view of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. *Mol. Psychiatry*, 2012; 17: 1206-1227

[25] Morphy R.: Selective multitargeted drugs. W: *Polypharmacology in drug discovery*, red.: J.U. Peters. John Wiley & Sons, Hoboken 2012, 247-262

[26] Morphy R., Kay C., Rankovic Z.: From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discov. Today*, 2004; 9: 641-651

[27] Morphy R., Rankovic Z.: Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J. Med. Chem.*, 2005; 48: 6523-6543

[28] Morphy R., Rankovic Z.: The physicochemical challenges of designing multiple ligands. *J. Med. Chem.*, 2006; 49: 4961-4970

[29] Müller-Schiffmann A., Sticht H., Korth C.: Hybrid compounds: from simple combinations to nanomachines. *BioDrugs*, 2012; 26: 21-31

[30] Peters J.U.: Polypharmacology - foe or friend? *J. Med. Chem.*, 2013; 56: 8955-8971

[31] Peters J.U.: Pharmacological promiscuity and molecular properties. W: *Polypharmacology in drug discovery*, red.: J.U. Peters. John Wiley & Sons, Hoboken 2012, 47-62

[32] Rapposelli S., Balsamo A.: Multifunctional drugs: new challenging chimeras in medicinal chemistry and drug discovery. W: *Multifunctional drugs: new chimeras in medicinal chemistry*, red.: S. Rapposelli. Transworld Research Network, Kerala 2010, 1-17

[33] Rizzo S., Bartolini M., Ceccarini L., Piazzi L., Gobbi S., Cavalli A., Recanatini M., Andrisano V., Rampa A.: Targeting Alzheimer's disease: novel indanone hybrids bearing a pharmacophoric fragment of AP2238. *Bioorg. Med. Chem.*, 2010; 18: 1749-1760

[34] Rodda J., Carter J.: Cholinesterase inhibitors and memantine for symptomatic treatment of dementia. *BMJ*, 2012; 344: e2986

[35] Roth B.L., Sheffler D.J., Kroeze W.K.: Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2004; 3: 353-359

[36] Rydzewski R.M.: Real world drug discovery: a chemist's guide to biotech and pharmaceutical research. Elsevier, Amsterdam 2008

[37] Sharom J.R., Bellows D.S., Tyers M.: From large networks to small molecules. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2004; 8: 81-90

[38] Steinhilber D., Schubert-Zsilavecz M., Roth H.J.: *Chemia medyczna*. MedPharm Polska, Wrocław 2012

[39] Viayna E., Sabate R., Muñoz-Torrero D.: Dual inhibitors of β -amyloid aggregation and acetylcholinesterase as multi-target anti-Alzheimer drug candidates. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2013; 13: 1820-1842

[40] Wermuth C.G.: Selective optimization of side activities: the SOSA approach. *Drug Discov. Today*, 2006; 11: 160-164

[41] Wilkinson D.G., Francis P.T., Schwam E., Payne-Parrish J.: Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs Aging*, 2004; 21: 453-478

[42] Youdim M.B.: Multi target neuroprotective and neurorestorative anti-Parkinson and anti-Alzheimer drugs ladostigil and M30 derived from rasagiline. *Exp. Neurobiol.*, 2013; 22: 1-10

[43] Youdim M.B., Weinstock M.: Molecular basis of neuroprotective activities of rasagiline and the anti-Alzheimer drug TV3326 [(N-propargyl-(3R)aminoindan-5-yl)-ethyl methyl carbamate]. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2001; 21: 555-573

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktów interesów.